

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
る事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2000年 1月20日

願 番 号  
Application Number:

特願2000-012210

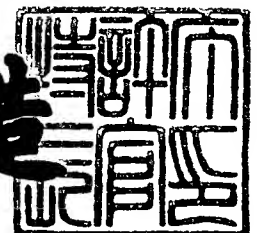
願 人  
Applicant (s):

株式会社いかがく

2000年 9月 8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



【書類名】 特許願

【整理番号】 P000120A

【提出日】 平成12年 1月20日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市伏見区羽束師古川町 3 2 8 番地 株式会社  
いかがく内

【氏名】 内田 壱夫

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市伏見区羽束師古川町 3 2 8 番地 株式会社  
いかがく内

【氏名】 真柴 新一

【特許出願人】

【識別番号】 000141875

【住所又は居所】 京都府京都市伏見区羽束師古川町 3 2 8 番地

【氏名又は名称】 株式会社いかがく

【代理人】

【識別番号】 100085316

【住所又は居所】 大阪府中央区伏見町 3 丁目 3 番 3 号芝川ビル 2 階 1 号

【弁理士】

【氏名又は名称】 福島 三雄

【電話番号】 06-6202-6117

【選任した代理人】

【識別番号】 100100376

【住所又は居所】 大阪府中央区伏見町 3 丁目 3 番 3 号芝川ビル 2 階 1 号

【弁理士】

【氏名又は名称】 野中 誠一

【電話番号】 06-6202-6117

【選任した代理人】

【識別番号】 100110685

【住所又は居所】 大阪市中央区伏見町 3 丁目 3 番 3 号芝川ビル 2 階 1 号

【弁理士】

【氏名又は名称】 小山 方宜

【電話番号】 06-6202-6117

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第207913号

【出願日】 平成11年 7月22日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 057004

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9809498

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 血液中の低比重リポ蛋白（LDL）もしくは変性低比重リポ蛋白の検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 低比重リポ蛋白（LDL）、またはLDLが酸化変性されてなる変性低比重リポ蛋白（変性LDL：酸化LDLを含む）と、

急性相反応物質、血液凝固・線溶系関連蛋白、もしくはマクロファージが産生する殺菌物質との

複合体を測定対象にする血液中のLDLおよび変性LDLの検出方法。

【請求項2】  $\alpha$ 1-アンチトリプシン、フィブリノーゲン、フィブ्रोネクチン、リポ蛋白（a）、C-reactive protein（CRP）、Serum amyloid A（SAA）、Serum amyloid P component（SAP）、 $\alpha$ 2-マクログロブリン、 $\alpha$ 1-アンチキモトリプシン、 $\alpha$ 1-アシドグリコプロティン、補体成分などの急性相反応物質と

LDLもしくは変性LDLとの

複合体を測定対象とする請求項1に記載のLDLもしくは変性LDLの検出方法。

【請求項3】 組織因子、プラスミノーゲン、プロトロンビン、トロンビン、アンチトロンビン3、プラスミンアクチベーターインヒビター1などの凝固・線溶系関連蛋白と

LDLもしくは変性LDLとの

複合体を測定対象とする請求項1に記載のLDLもしくは変性LDLの検出方法。

【請求項4】 ミエロペルオキシダーゼ、ラクトフェリン、リゾチーム、塩基性蛋白などのマクロファージが産生する殺菌物質と

LDLもしくは変性LDLとの

複合体を測定対象とする請求項1に記載のLDLもしくは変性LDLの検出方法。

【請求項5】 酵素免疫法、ラテックス凝集法、免疫発光分析法、イムノクロ

マト法などの免疫学的測定法を用いる請求項 1 ～ 4 に記載の LDL もしくは変性 LDL の検出方法。

【請求項 6】抗ヒトフィブリノーゲン抗体と、酵素をはじめとする標識物質を標識した抗ヒト Apo B 抗体などの免疫反応検出試薬を用いる請求項 2 に記載の動脈硬化性病変に関わる新規ナリポ蛋白の検出方法。

【請求項 7】抗ヒトフィブロネクチン抗体と、酵素をはじめとする標識物質を標識した抗ヒト Apo B 抗体などの免疫反応検出試薬を用いる請求項 2 に記載の動脈硬化性病変に関わる新規ナリポ蛋白の検出方法。

【請求項 8】マウス骨髓腫細胞と、LDL/フィブロネクチン複合体で免疫された哺乳類の脾臓細胞とを融合させて得られるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体であって、native なフィブロネクチンや Apo B (native および変性 Apo B) には反応せず、LDL/フィブロネクチン複合体を特異的に認識するモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

この発明は、血液中に存在する変性 LDL (特に酸化変性 LDL) が、生体内における急性相反応の過程で産生される (急性相反応蛋白の一部はマクロファージも産生する) ところの各種急性相反応物質 (acute phase reactants) や、各種の凝固・線溶系関連蛋白、もしくはマクロファージが産生する各種の殺菌物質と複合体を形成して存在することを見出すとともに、この点に着目した新規な変性 LDL (特に酸化変性 LDL) の検出方法に関するもので、動脈硬化性病変やアルツハイマー病などの早期診断や治療上での薬効評価などに寄与せんとするものである。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】

動脈硬化症は大動脈、冠状動脈、脳動脈および頸動脈に多く発生し、心筋梗塞、脳梗塞などの主因となる疾患である。また、最近ではアルツハイマー病も動脈硬化症と関連性の大きい疾患であることがわかってきた。従来、血液中で、これ

らの生体内での動脈硬化症の状態を直接反映する測定対象がなく、血清中あるいは血漿中のLDL、LP(a)、レムナントリポ蛋白、Small, dense LDLなど、LDLを主体とした血管壁脂質蓄積と関わりの深い、動脈硬化性病変に関わりポ蛋白として測定されてきた。なかんずく、酸化LDLと粥状動脈硬化病変の進展との関連がスタインバーグ(Steinberg, D. et al. Engl. Med. 320:915, 1989)により、一方、Rossらが提唱した傷害反応仮説(Ross, R. Nature. 362:801, 1993)によって指摘されて以来、動脈硬化の進展における酸化LDLの関与が注目されてきた。

#### 【0003】

さらに、最近では、動脈硬化を炎症として捉える立場の研究が盛んである(Ross, R. Ncw. Engl. J. Med. 340:115~126, 1999)。急性相反応と動脈硬化の関連性に関して(西順一郎, 他. 動脈硬化. 24:363~367, 1996)によれば、生体は感染や外傷などの外からの刺激に対して、発熱、血管透過性亢進による浮腫、血小板凝集と凝固亢進による止血、免疫担当細胞の活性化を通じて、すみやかに病原体の排除や組織障害の回復を図り恒常性を維持する。この生体反応を急性相反応(Acute phase response)と呼んでいる。感染や外傷などの外的刺激に対するこの生体反応は、人類の進化とともに発達してきた重要な防御機構である。一方、今世紀に入って、われわれ人類の生活環境の急激な変化は、この外的刺激を減少させる一方で、高脂血症・高血糖などの内部環境の変化を通じて、酸化変性LDLやAdvanced glycation endproduct (AGE)などの生体内修飾物質をも増加させる結果を生んできた。マクロファージ系細胞や血管内皮細胞には、これらの生体内修飾物質を認識する特異的レセプターが発現しており、生体はこれらの細胞を通じて生体内修飾物質を処理する機構を有している。このことは酸化LDLやAGEが体内では異物として作用していることを示しており、この‘異物処理過程’で、はからずもマクロファージ・内皮細胞の活性化がひき起こされる。即ちこの一連の過程は動脈硬化の成立プロセスとみなすことが出来る。

#### 【0004】

そして、上述の生体反応、即ち急性相反応の過程で、血漿中に有意に増加してくる物質を急性相反応物質あるいは急性相反応蛋白と呼び、表1に示すような主

な物質群からなっている (Steel DM, et al. Immuno Today, 15 : 81~88, 1994)

。

【 0 0 0 5 】

【表 1】

表 1 代表的な急性相反応蛋白の種類 \*

Major APRs	Complement proteins	Coagulation proteins
C-reactive protein	C2, C3, C4, C5, C9	Fibrinogen
Serum amyloid A	Factor B	von willebrand factor
Serum amyloid P component	C1 inhibitor	
	C4 binding protein	
Proteinase inhibitors	Metal-binding proteins	other proteins
$\alpha_1$ -antitrypsin	Haptoglobin	$\alpha_1$ -acid glycoprotein
$\alpha_1$ -antichymotrypsin	Hemopexin	Heme oxygenase
$\alpha_2$ -antiplasmin	Ceruloplasmin	Mannose-binding protein
Heparin cofactor II	Manganese superoxide dismutase	Lipoprotein (a)
Plasminogen activator		LPS binding protein
inhibitor 1		Fibronectin
$\alpha_2$ -macroglobulin		

\* Steel MDらのデータを一部改変 (Steel DM. et al. Immunol Today. 15: 81, 1994)

【 0 0 0 6 】

一方、ヒト大動脈粥状硬化病変部に急性相反応物質が局在することが免疫組織

化学染色法やin situ hybridization法で確認されている。CRP、SAA、SAPに関しては（畑中薫，他．動脈硬化．24：551～555，1997）、fibrinogenおよびその分解産物に関して（Bini, A. et al. Arteriosclerosis. 9：109～121. 1989）、 $\alpha 1$ -アンチトリプシンに関して（竹屋元裕．未発表，1999）が知られている。

#### 【0007】

現状では動脈硬化における各種急性相反応物質の役割分担については不明な点が多く、今後の研究の進展が期待されている。また、動脈硬化病変には組織因子（TF）の過剰発現とともに、血管内で生じたフィブリン血栓の溶解に関与する組織プラスミノゲンアクチベーター（t-PA）の阻害因子であるプラスミノゲンアクチベーターインヒビター（PAI）活性やトロンビン受容体も同時に亢進しており、これらの因子も動脈硬化内膜の凝固亢進に関与していることが知られている（小川久雄．最新医学．54：1210～1217，1999）。さらに、動脈硬化の発生進展に関連して動脈壁でおこる種々の病的現象は、フィブリンを中心として凝固線溶系の諸因子が複雑に関連して進展する、即ち、動脈硬化病変部位は血栓形成の“場”となりやすいことも知られている（田中健蔵．日本老年医学会雑誌．35：880～890，1998）。また、上述のごとくアテローム性動脈硬化においては血液中のLDLが血管壁に沈着すると、内皮細胞が活性化され、血中の単球がもぐり込んできてマクロファージとなり血管壁に沈着したLDLを異物として処理する以外にも、最近の報告によると、動脈硬化の発症・進展にクラミジアニューモニエやヘリコバクターピロリ菌の感染が関与することも知られ（Murat V, et al. JID. 177：725～729, 1998）、（Patel P, et al. BMJ. 311：711～714, 1995）、また、動脈硬化病変部位において、これらの病原菌の存在が確認されている。従って、動脈硬化病変部位に浸潤したマクロファージは、血管壁に沈着したLDLの処理以外に、これら病原菌の排除のためにも種々の殺菌物質を血管壁で放出する状況にあるといえる。

#### 【0008】

一方、この様に、動脈硬化発症、進展に関わる要因の解明が進む反面、変性LDL（酸化変性LDL）の測定法に関しては、血中で簡易に正確性をもって測定

する方法が存在しなかった。したがって本研究は、動脈硬化症やアルツハイマー病の発症・進展と深く関わる、LDLおよび変性LDL（特に酸化LDL）の新規な検出方法を提供することを課題とする。

## 【0009】

## 【課題を解決するための手段】

生体の主要な構成成分として蛋白質、脂質、糖質、核酸があげられるが、最も酸化されやすいのは脂質であり、酸素添加反応が起こり、いわゆる過酸化脂質が生成する。脂質が酸化されやすいのは多くの脂質がリノール酸やアラキドン酸のような高度不飽和脂肪酸のエステルとなっているためである。リポ蛋白は脂質と蛋白質から構成されており、リポ蛋白が酸化された場合には、脂質、蛋白質共に酸化変性を受ける。

## 【0010】

この生体脂質が非酵素的に酸化される引き金としては、活性酸素が考えられている。この過酸化脂質の測定は順相HPLC法などの分析化学的手法が用いられ、健常人の生体内でも確実に脂質の非酵素的酸化が起きていることが証明されている（山本順寛，他．蛋白質・核酸・酵素．44：1253，1999）。

## 【0011】

上述のごとく現状では、血液中の総過酸化脂質量の把握は可能であるが、リポ蛋白個別の酸化変性度を知る方法は現在のところ存在せず、LDLの酸化変性体が血液中に存在することの実証は、本発明者らの特願平8-317162号による方法によって初めて成された。さらに本発明者は、特願平11-109001号、特願平11-207913号に開示した手法によっても血液中の酸化変性LDLの検出が可能であることを発見した。

## 【0012】

そして、その後、更なる研究と検討を繰り返した結果、循環血液中に酸化変性LDLが種々の急性相反応物質や、血液凝固・線溶関連蛋白もしくは、マクロファージが産生する各種殺菌物質（滝 龍雄，他．医学のあゆみ．156：194～197．1991）と複合体を形成して存在する事実を発見して本発明に至った。即ち、特願平8-317162号、および、特願平11-207913号の手法を発展さ

せて、血液中のLDLおよび変性LDL（特に酸化変性LDL）の検出方法確立して本発明を完成させたものである。

#### 【0013】

より具体的に説明すると、本発明は、たとえば、血管内壁下でLDLが酸化変性を受けるとその局所に血管腔から滲み込んだないしは、マクロファージが産生したところの表1に示すような代表的な急性相反応蛋白（ $\alpha 1$ -アンチトリプシン、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、CRP、SAA、SPA、 $\alpha 1$ -アンチキモトリプシン、 $\alpha 1$ -アシドグリコプロテイン、 $\alpha 2$ -マクログロブリン）と変性LDL（特に酸化変性LDL）が複合体を形成すること、さらに、動脈硬化内膜での凝固亢進に関与する（組織因子、プラスミノゲン、プロトロンビン、トロンビン、アンチトロンビン3、プラスミンアクチベーターインヒビター1など）蛋白とも変性LDL（特に酸化変性LDL）が複合体を形成することおよび、動脈硬化病変部位に浸潤してきたマクロファージが、異物処理過程で放出するミエロペルオキシダーゼ、ラクトフェリン、リゾチーム、塩基性蛋白などの殺菌物質ともLDLおよび変性LDL（特に酸化変性LDL）が複合体を形成することを見出した。これらのいずれの複合体も動脈硬化症の発症・進展と関連性が高い点を見出して完成されたものである。

#### 【0014】

なお典型的には、本発明は、酸化変性LDLと $\alpha 1$ -アンチトリプシンの複合体を特異的に認識する抗体（特願平8-317162号）を作製したと同様に、LDLおよび酸化変性LDLと複合体を形成している各種抗原に対する特異抗体を作製、または、抗ヒトフィブリノーゲン抗体（DAKO）を固相抗体として用い、LDLおよび酸化変性LDLと各種蛋白との複合体を反応させた後に、酵素をはじめとする標識物をラベルした抗ヒトApoB抗体を反応させて、血液中の酸化変性LDLを検出する方法である。

#### 【0015】

この場合、用いる試料は血液中のLDLを超遠心法や、デキストラン硫酸とカルシウムイオンなどの化学物質を用いた沈澱法で分画したLDLもしくは、血清や血漿をそのまま試料として測定することも可能である。

また、これらの各種蛋白と複合体を形成したLDLおよび酸化変性LDLの検出法の臨床応用としては、動脈硬化症やアルツハイマー病の早期診断や、動脈硬化症治療薬投与時の薬効評価などに好適である。

【0016】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について具体的に説明する。

A. 急性相反応物質と複合体を形成したLDLもしくは酸化変性LDLの検出例

(A-1) [超遠心または硫酸デキストラン/Ca沈澱法により調整したLDL中のLDLもしくは変性LDL (酸化変性LDL) /CRP複合体の測定]

【0017】

1、抗ヒトCRPポリクローナル抗体 (DAKO社) を0.05M Tris-HCl (0.15M NaClを含む、pH8.0) 緩衝液に10  $\mu$ g/mlの割合で加え、マイクロプレートに100  $\mu$ l/wellで分注する。

2、4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン水で3回洗浄し、0.1%ショ糖および牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M Tris-HCl緩衝液 (pH7.5) を10  $\mu$ l/wellで分注し、室温で30分以上静置した後、液を棄て4℃で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水250  $\mu$ l/wellで3回洗浄する。

3、マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma GlobulinとGoat Gamma Globulin含有1%ウシアルブミン溶液を100  $\mu$ l/well分注し、これに試料あるいは標準液を50  $\mu$ l添加する。

4、37℃で1.5時間反応させる。

5、0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

6、ビオチン標識Fab' 化IgG-apoB/427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6  $\mu$ g/mlとしたものを100  $\mu$ l/well分注する。

7、37℃で1.5時間反応させる。

8、3、と同様に0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

【0018】

9、HRP標識アビジンD (Vector laboratories社製) を1%カゼイン溶液で

1 5 0 0 0 倍希釈とし、1 0 0  $\mu$ l/well分注する。

1 0、3 7℃下で3 0分間反応させる。

1 1、0. 0 0 5 %Tween20溶液 2 5 0  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

1 2、過酸化水素溶液とTMB Z溶液からなる呈色試薬を1 0 0  $\mu$ l/well分注し、室温下3 0分間反応させる。

1 3、1 Mリン酸水溶液を1 0 0  $\mu$ l/well分注し、反応を停止させる。

1 4、主波長4 5 0 nm、副波長6 3 0 nmで測光する。

1 5、人工的に調整した変性LDL（酸化LDL）／CRP複合体により求めた検量線から試料中の変性LDL（酸化LDL）／CRP複合体濃度を算出する。

【0 0 1 9】

（A-2）〔超遠心または硫酸デキストラン／Ca沈澱法により調整したLDL中のLDLもしくは変性LDL（酸化変性LDL）／アミロイドA複合体の測定〕

【0 0 2 0】

1、抗ヒトアミロイドAポリクローナル抗体（DAKO社）を0. 0 5 M Tris-HCl（0. 1 5 M NaClを含む、pH 8. 0）緩衝液に1 0  $\mu$ g/mlの割合で加え、マイクロプレートに1 0 0  $\mu$ l/wellで分注する。

2、4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン水で3回洗浄し、0.

1 %ショ糖および牛血清アルブミン、0. 0 5 %アジ化ナトリウムを含む0. 0 5 M Tris-HCl緩衝液（pH 7. 5）を1 0  $\mu$ l/wellで分注し、室温で3 0分以上静置した後、液を棄て4℃で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水 2 5 0  $\mu$ l/wellで3回洗浄する。

3、マイクロプレートに5 5 mg/ml Mouse Gamma GlobulinとGoat Gamma Globlin含有1 %ウシアルブミン溶液を1 0 0  $\mu$ l/well分注し、これに試料あるいは標準液を5 0  $\mu$ l添加する。

4、3 7℃で1. 5時間反応させる。

5、0. 0 0 5 %Tween20溶液 2 5 0  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

6、ビオチン標識Fab' 化IgG-apoB/427モノクローナル抗体を1 %BSA溶液で1. 6  $\mu$ g/mlとしたものを1 0 0  $\mu$ l/well分注する。

7、37℃で1.5時間反応させる。

8、3、と同様に0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

【0021】

9、HRP標識アビジンD (Vector laboratories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100  $\mu$ l/well分注する。

10、37℃下で30分間反応させる。

11、0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

12、過酸化水素溶液とTMBZ溶液からなる呈色試薬を100  $\mu$ l/well分注し、室温下30分間反応させる。

13、1Mリン酸水溶液を100  $\mu$ l/well分注し、反応を停止させる。

14、主波長450nm、副波長630nmで測光する。

15、人工的に調整した変性LDL (酸化LDL) / アミロイドA複合体により求めた検量線から試料中の変性LDL (酸化LDL) / アミロイドA複合体濃度を算出する。

【0022】

(A-3) [超遠心または硫酸デキストラン/Ca沈澱法により調整したLDL中のLDLもしくは変性LDL (酸化変性LDL) /  $\alpha$ 2-マクログロブリン複合体の測定]

【0023】

1、抗ヒト $\alpha$ 2-マクログロブリンポリクローナル抗体 (DAKO社) を0.05M Tris-HCl (0.15M NaClを含む、pH8.0) 緩衝液に10  $\mu$ g/mlの割合で加え、マイクロプレートに100  $\mu$ l/wellで分注する。

2、4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン水で3回洗浄し、0.1%ショ糖および牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M Tris-HCl緩衝液 (pH7.5) を10  $\mu$ l/wellで分注し、室温で30分以上静置した後、液を棄て4℃で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水250  $\mu$ l/wellで3回洗浄する。

3、マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma GlobulinとGoat Gamma Globulin含有1%ウシアルブミン溶液を100  $\mu$ l/well分注し、これに試料あるいは標準

液を 5 0  $\mu$  l 添加する。

4、3 7℃で 1. 5 時間反応させる。

5、0. 0 0 5 % Tween20 溶液 2 5 0  $\mu$  l/well で 5 回洗浄する。

6、ビオチン標識 F a b' 化 IgG-apoB/427 モノクローナル抗体を 1 % B S A 溶液で 1. 6  $\mu$  g/ml としたものを 1 0 0  $\mu$  l/well 分注する。

7、3 7℃で 1. 5 時間反応させる。

8、3、と同様に 0. 0 0 5 % Tween20 溶液 2 5 0  $\mu$  l/well で 5 回洗浄する。

【 0 0 2 4 】

9、H R P 標識 アビジン D (Vector laboratories 社製) を 1 % カゼイン溶液で 1 5 0 0 0 倍希釈とし、1 0 0  $\mu$  l/well 分注する。

1 0、3 7℃下で 3 0 分間反応させる。

1 1、0. 0 0 5 % Tween20 溶液 2 5 0  $\mu$  l/well で 5 回洗浄する。

1 2、過酸化水素溶液と T M B Z 溶液からなる呈色試薬を 1 0 0  $\mu$  l/well 分注し、室温下 3 0 分間反応させる。

1 3、1 M リン酸水溶液を 1 0 0  $\mu$  l/well 分注し、反応を停止させる。

1 4、主波長 4 5 0 nm、副波長 6 3 0 nm で測光する。

1 5、人工的に調整した変性 L D L (酸化 L D L) /  $\alpha$  2 - マクログロブリン複合体により求めた検量線から試料中の変性 L D L (酸化 L D L) /  $\alpha$  2 - マクログロブリン複合体濃度を算出する。

【 0 0 2 5 】

(A - 4) [超遠心または硫酸デキストラン / C a 沈澱法により調整した L D L 中の L D L もしくは変性 L D L (酸化変性 L D L) /  $\alpha$  1 - アンチキモトリプシン複合体の測定]

【 0 0 2 6 】

1、抗ヒト  $\alpha$  1 - アンチキモトリプシンポリクローナル抗体 (D A K O 社) を 0. 0 5 M Tris-HCl (0. 1 5 M NaCl を含む、pH 8. 0) 緩衝液に 1 0  $\mu$  g/ml の割合で加え、マイクロプレートに 1 0 0  $\mu$  l/well で分注する。

2、4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン水で 3 回洗浄し、0.

1 % ショ糖および牛血清アルブミン、0. 0 5 % アジ化ナトリウムを含む 0. 0

5M Tris-HCl緩衝液 (pH7.5) を10  $\mu$ l/wellで分注し、室温で30分以上静置した後、液を棄て4℃で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水250  $\mu$ l/wellで3回洗浄する。

3、マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma GlobulinとGoat Gamma Globulin含有1%ウシアルブミン溶液を100  $\mu$ l/well分注し、これに試料あるいは標準液を50  $\mu$ l添加する。

4、37℃で1.5時間反応させる。

5、0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

6、ビオチン標識Fab' 化IgG-apoB/427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6  $\mu$ g/mlとしたものを100  $\mu$ l/well分注する。

7、37℃で1.5時間反応させる。

8、3、と同様に0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

#### 【0027】

9、HRP標識アビジンD (Vector laboratories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100  $\mu$ l/well分注する。

10、37℃下で30分間反応させる。

11、0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

12、過酸化水素溶液とTMBZ溶液からなる呈色試薬を100  $\mu$ l/well分注し、室温下30分間反応させる。

13、1Mリン酸水溶液を100  $\mu$ l/well分注し、反応を停止させる。

14、主波長450nm、副波長630nmで測光する。

15、人工的に調整した変性LDL (酸化LDL) / $\alpha$ 1-アンチキモトリプシン複合体により求めた検量線から試料中の変性LDL (酸化LDL) / $\alpha$ 1-アンチキモトリプシン複合体濃度を算出する。

#### 【0028】

(A-5) [超遠心または硫酸デキストラン/Ca沈澱法により調整したLDL中のLDLもしくは変性LDL (酸化変性LDL) / $\alpha$ 1-アシドグリコプロテイン複合体の測定]

#### 【0029】

- 1、抗ヒト $\alpha$ 1-アシドグリコプロテインポリクローナル抗体（DAKO社）を0.05M Tris-HCl（0.15M NaClを含む、pH8.0）緩衝液に10 $\mu$ g/mlの割合で加え、マイクロプレートに100 $\mu$ l/wellで分注する。
- 2、4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン水で3回洗浄し、0.1%ショ糖および牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M Tris-HCl緩衝液（pH7.5）を10 $\mu$ l/wellで分注し、室温で30分以上静置した後、液を棄て4℃で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水250 $\mu$ l/wellで3回洗浄する。
- 3、マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma GlobulinとGoat Gamma Globulin含有1%ウシアルブミン溶液を100 $\mu$ l/well分注し、これに試料あるいは標準液を50 $\mu$ l添加する。
- 4、37℃で1.5時間反応させる。
- 5、0.005%Tween20溶液250 $\mu$ l/wellで5回洗浄する。
- 6、ビオチン標識Fab'化IgG-apoB/427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6 $\mu$ g/mlとしたものを100 $\mu$ l/well分注する。
- 7、37℃で1.5時間反応させる。
- 8、3、と同様に0.005%Tween20溶液250 $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

【0030】

- 9、HRP標識アビジンD（Vector laboratories社製）を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100 $\mu$ l/well分注する。
- 10、37℃下で30分間反応させる。
- 11、0.005%Tween20溶液250 $\mu$ l/wellで5回洗浄する。
- 12、過酸化水素溶液とTMBZ溶液からなる呈色試薬を100 $\mu$ l/well分注し、室温下30分間反応させる。
- 13、1Mリン酸水溶液を100 $\mu$ l/well分注し、反応を停止させる。
- 14、主波長450nm、副波長630nmで測光する。
- 15、人工的に調整した変性LDL（酸化LDL）/ $\alpha$ 1-アシドグリコプロテイン複合体により求めた検量線から試料中の変性LDL（酸化LDL）/ $\alpha$ 1-アシドグリコプロテイン複合体濃度を算出する。

【 0 0 3 1 】

B. 血液凝固・線溶系関連蛋白と複合体を形成したLDLもしくは酸化変性LDLの検出例

(B-1) [超遠心または硫酸デキストラン/Ca沈澱法により調整したLDL中のLDLもしくは変性LDL(酸化変性LDL)/トロンビン複合体の測定]

【 0 0 3 2 】

1、抗ヒトトロンビンポリクローナル抗体(DAKO社)を0.05M Tris-HCl(0.15M NaClを含む、pH8.0)緩衝液に10 $\mu$ g/mlの割合で加え、マイクロプレートに100 $\mu$ l/wellで分注する。

2、4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン水で3回洗浄し、0.1%ショ糖および牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)を10 $\mu$ l/wellで分注し、室温で30分以上静置した後、液を棄て4℃で乾燥させる。乾焼したマイクロプレートを脱イオン水250 $\mu$ l/wellで3回洗浄する。

3、マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma GlobulinとGoat Gamma Globulin含有1%ウシアルブミン溶液を100 $\mu$ l/well分注し、これに試料あるいは標準液を50 $\mu$ l添加する。

4、37℃で1.5時間反応させる。

5、0.005%Tween20溶液250 $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

6、ビオチン標識Fab'化IgG-apoB/427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6 $\mu$ g/mlとしたものを100 $\mu$ l/well分注する。

7、37℃で1.5時間反応させる。

8、3、と同様に0.005%Tween20溶液250 $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

【 0 0 3 3 】

9、HRP標識アビジンD(Vector laboratories社製)を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100 $\mu$ l/well分注する。

10、37℃下で30分間反応させる。

11、0.005%Tween20溶液250 $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

12、過酸化水素溶液とTMBZ溶液からなる呈色試薬を100 $\mu$ l/well分注し

、室温下 3 0 分間反応させる。

1 3、1 M リン酸水溶液を 1 0 0  $\mu$  l / well 分注し、反応を停止させる。

1 4、主波長 4 5 0 nm、副波長 6 3 0 nm で測光する。

1 5、人工的に調整した変性 LDL (酸化 LDL) / トロンビン複合体により求めた検量線から試料中の変性 LDL (酸化 LDL) / トロンビン複合体濃度を算出する。

【 0 0 3 4 】

(B - 2) [超遠心または硫酸デキストラン / C a 沈澱法により調整した LDL 中の LDL もしくは変性 LDL (酸化変性 LDL) / アンチトロンビン 3 複合体の測定]

【 0 0 3 5 】

1、抗ヒトアンチトロンビン 3 ポリクローナル抗体 (D A K O 社) を 0 . 0 5 M Tris-HCl (0 . 1 5 M NaCl を含む、pH 8 . 0) 緩衝液に 1 0  $\mu$  g / ml の割合で加え、マイクロプレートに 1 0 0  $\mu$  l / well で分注する。

2、4  $^{\circ}$  C 下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン水で 3 回洗浄し、0 . 1 % ショ糖および牛血清アルブミン、0 . 0 5 % アジ化ナトリウムを含む 0 . 0 5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7 . 5) を 1 0  $\mu$  l / well で分注し、室温で 3 0 分以上静置した後、液を棄て 4  $^{\circ}$  C で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水 2 5 0  $\mu$  l / well で 3 回洗浄する。

3、マイクロプレートに 5 5 mg / ml Mouse Gamma Globulin と Goat Gamma Globulin 含有 1 % ウシアルブミン溶液を 1 0 0  $\mu$  l / well 分注し、これに試料あるいは標準液を 5 0  $\mu$  l 添加する。

4、3 7  $^{\circ}$  C で 1 . 5 時間反応させる。

5、0 . 0 0 5 % Tween20 溶液 2 5 0  $\mu$  l / well で 5 回洗浄する。

6、ビオチン標識 F a b ' 化 IgG-apoB / 427 モノクローナル抗体を 1 % B S A 溶液で 1 . 6  $\mu$  g / ml としたものを 1 0 0  $\mu$  l / well 分注する。

7、3 7  $^{\circ}$  C で 1 . 5 時間反応させる。

8、3、と同様に 0 . 0 0 5 % Tween20 溶液 2 5 0  $\mu$  l / well で 5 回洗浄する。

【 0 0 3 6 】

- 9、HRP 標識アビジン D (Vector laboratories 社製) を 1 % カゼイン溶液で 1 5 0 0 0 倍希釈とし、1 0 0  $\mu$  l/well 分注する。
- 1 0、3 7℃下で 3 0 分間反応させる。
- 1 1、0. 0 0 5 % Tween20 溶液 2 5 0  $\mu$  l/well で 5 回洗浄する。
- 1 2、過酸化水素溶液と TMB Z 溶液からなる呈色試薬を 1 0 0  $\mu$  l/well 分注し、室温下 3 0 分間反応させる。
- 1 3、1 M リン酸水溶液を 1 0 0  $\mu$  l/well 分注し、反応を停止させる。
- 1 4、主波長 4 5 0 nm、副波長 6 3 0 nm で測光する。
- 1 5、人工的に調整した変性 LDL (酸化 LDL) / アンチトロニン 3 複合体により求めた検量線から試料中の変性 LDL (酸化 LDL) / アンチトロニン 3 複合体濃度を算出する。

【 0 0 3 7 】

(B-3) [超遠心または硫酸デキストラン / C a 沈澱法により調整した LDL 中の LDL もしくは変性 LDL (酸化変性 LDL) / プラスミノージェンアクチベータインヒビター 1 複合体の測定]

【 0 0 3 8 】

- 1、抗ヒトプラスミノージェンアクチベータインヒビター 1 ポリクローナル抗体 (DAKO 社) を 0. 0 5 M Tris-HCl (0. 1 5 M NaCl を含む、pH 8. 0) 緩衝液に 1 0  $\mu$  g/ml の割合で加え、マイクロプレートに 1 0 0  $\mu$  l/well で分注する。
- 2、4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン水で 3 回洗浄し、0. 1 % ショ糖および牛血清アルブミン、0. 0 5 % アジ化ナトリウムを含む 0. 0 5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7. 5) を 1 0  $\mu$  l/well で分注し、室温で 3 0 分以上静置した後、液を棄て 4℃で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水 2 5 0  $\mu$  l/well で 3 回洗浄する。
- 3、マイクロプレートに 5 5 mg/ml Mouse Gamma Globulin と Goat Gamma Globulin 含有 1 % ウシアルブミン溶液を 1 0 0  $\mu$  l/well 分注し、これに試料あるいは標準液を 5 0  $\mu$  l 添加する。
- 4、3 7℃で 1. 5 時間反応させる。
- 5、0. 0 0 5 % Tween20 溶液 2 5 0  $\mu$  l/well で 5 回洗浄する。

6、ビオチン標識 Fab' 化IgG-apoB/427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6  $\mu$ g/mlとしたものを100  $\mu$ l/well分注する。

7、37℃で1.5時間反応させる。

8、3、と同様に0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

【0039】

9、HRP標識アビジンD (Vector laboratories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100  $\mu$ l/well分注する。

10、37℃下で30分間反応させる。

11、0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

12、過酸化水素溶液とTMBZ溶液からなる呈色試薬を100  $\mu$ l/well分注し、室温下30分間反応させる。

13、1Mリン酸水溶液を100  $\mu$ l/well分注し、反応を停止させる。

14、主波長450nm、副波長630nmで測光する。

15、人工的に調整した変性LDL (酸化LDL) /プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1複合体により求めた検量線から試料中の変性LDL (酸化LDL) /プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1複合体濃度を算出する。

【0040】

C. マクロファージが産生する殺菌物質と複合体を形成したLDLもしくは酸化変性LDLの検出例

(C-1) [超遠心または硫酸デキストラン/Ca沈澱法により調整したLDL中のLDLもしくは変性LDL (酸化変性LDL) /ミエロペルオキシダーゼ複合体の測定]

【0041】

1、抗ヒトミエロペルオキシダーゼポリクローナル抗体 (DAKO社) を0.05M Tris-HCl (0.15M NaClを含む、pH8.0) 緩衝液に10  $\mu$ g/mlの割合で加え、マイクロプレートに100  $\mu$ l/wellで分注する。

2、4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン水で3回洗浄し、0.

1%ショ糖および牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05M Tris HCl緩衝液 (pH7.5) を10  $\mu$ l/wellで分注し、室温で30分以上静

置した後、液を棄て4℃で乾焼させる。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水250  $\mu$ l/wellで3回洗浄する。

3、マイクロプレートに55mg/ml Mouse Gamma GlobulinとGoat Gamma Globulin含有1%ウシアルブミン溶液を100  $\mu$ l/well分注し、これに試料あるいは標準液を50  $\mu$ l添加する。

4、37℃で1.5時間反応させる。

5、0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

6、ビオチン標識Fab'化IgG-apoB/427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6  $\mu$ g/mlとしたものを100  $\mu$ l/well分注する。

7、37℃で1.5時間反応させる。

8、3、と同様に0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

#### 【0042】

9、HRP標識アビジンD (Vector laboratories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100  $\mu$ l/well分注する。

10、37℃下で30分間反応させる。

11、0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

12、過酸化水素溶液とTMBZ溶液からなる呈色試薬を100  $\mu$ l/well分注し、室温下30分間反応させる。

13、1Mリン酸水溶液を100  $\mu$ l/well分注し、反応を停止させる。

14、主波長450nm、副波長630nmで測光する。

15、人工的に調整した変性LDL (酸化LDL) /ミエロペルオキシダーゼ複合体により求めた検量線から試料中の変性LDL (酸化LDL) /ミエロペルオキシダーゼ複合体濃度を算出する。

#### 【0043】

(C-2) [超遠心または硫酸デキストラン/Ca沈澱法により調整したLDL中のLDLもしくは変性LDL (酸化変性LDL) /ラクトフェリン複合体の測定]

#### 【0044】

1、抗ヒトラクトフェリンポリクローナル抗体 (DAKO社) を0.05M Tris

-HCl (0.15 M NaClを含む、pH 8.0) 緩衝液に10  $\mu$ g/mlの割合で加え、マイクロプレートに100  $\mu$ l/wellで分注する。

2、4℃下で一夜、物理吸着させた後、使用時に脱イオン水で3回洗浄し、0.1%ショ糖および牛血清アルブミン、0.05%アジ化ナトリウムを含む0.05 M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) を10  $\mu$ l/wellで分注し、室温で30分以上静置した後、液を棄て4℃で乾燥させる。乾燥したマイクロプレートを脱イオン水250  $\mu$ l/wellで3回洗浄する。

3、マイクロプレートに55 mg/ml Mouse Gamma GlobulinとGoat Gamma Globulin含有1%ウシアルブミン溶液を100  $\mu$ l/well分注し、これに試料あるいは標準液を50  $\mu$ l添加する。

4、37℃で1.5時間反応させる。

5、0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

6、ビオチン標識Fab'化IgG-apoB/427モノクローナル抗体を1%BSA溶液で1.6  $\mu$ g/mlとしたものを100  $\mu$ l/well分注する。

7、37℃で1.5時間反応させる。

8、3、と同様に0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

#### 【0045】

9、HRP標識アビジンD (Vector laboratories社製) を1%カゼイン溶液で15000倍希釈とし、100  $\mu$ l/well分注する。

10、37℃下で30分間反応させる。

11、0.005%Tween20溶液250  $\mu$ l/wellで5回洗浄する。

12、過酸化水素溶液とTMB Z溶液からなる呈色試薬を100  $\mu$ l/well分注し、室温下30分間反応させる。

13、1 Mリン酸水溶液を100  $\mu$ l/well分注し、反応を停止させる。

14、主波長450 nm、副波長630 nmで測光する。

15、人工的に調整した変性LDL (酸化LDL) /ラクトフェリン複合体により求めた検量線から試料中の変性LDL (酸化LDL) /ラクトフェリン複合体濃度を算出する。

#### 【0046】

D. 各種脂質濃度別血清中のLDLもしくは変性LDL（酸化LDL）と急性相反応蛋白または、凝固・線溶系蛋白または、殺菌蛋白との複合体濃度の比較  
 血清中脂質条件1群（コレステロール160mg/dl>, 中性脂肪100mg/dl>, HDLコレステロール40～90mg/dl）、脂肪条件2群（コレステロール161～219mg/dl>, 中性脂肪101～139mg/dl>, HDLコレステロール40～90mg/dl）、脂肪条件3群（コレステロール220mg/dl<, 中性脂肪140mg/dl<, HDLコレステロール40mg/dl>）、の3群について、LDLもしくは変性LDL（酸化LDL）と急性相反応蛋白複体の測定例として（アミロイドA蛋白と $\alpha$ 2-マクログロブリン）、LDLもしくは変性LDL（酸化変性）と凝固・線溶系蛋白複体の測定例として（プロトロンビン、アンチトロンビン3）、マクロファージが産生する殺菌物質とLDLもしくは変性LDL（酸化LDL）との複体の測定例として（ミエロペルオキシダーゼ、ラクトフェリン）の血清中濃度を比較したところ、いずれの複合体濃度も第3群（高脂質血症群）において最も高値を示した（図1）。

【0047】

E. 先の出願（特願平11-207913号）

（E-1）先の発明に至る経緯

【0048】

先の出願に先立って、本発明者は、LDLとフィブリノーゲンおよびLDLとフィブロネクチンの複合体形成を試み、人工的に酸化変性を受けたLDLにより複合体が形成されることを確認した。即ち、nativeLDL、糖化LDLおよび、酸化LDLに精製品フィブリノーゲン又はフィブロネクチンを添加し、いずれのLDLがフィブリノーゲン又はフィブロネクチンと複合体を形成するかを検討した。各LDLとフィブリノーゲン又はフィブロネクチンの混合試料をアガロース電気泳動後、ファットレッド(Fat red)7Bによる脂質染色およびイムノブロット(immunoblot)法によるフィブリノーゲン又はフィブロネクチン染色を行った。

【0049】

その結果、nativeLDLおよび糖化LDLとフィブリノーゲン又はフィブロネクチンの混合試料では複合体形成を認めなかったが、血管内皮細胞処理か硫酸銅

処理により調整した酸化LDLとフィブリノーゲン又はフィブロネクチンの混合試料では複合体（酸化LDL-フィブリノーゲン複合体、酸化LDL-フィブロネクチン複合体）の形成を認めた。さらに、糖尿病や心筋梗塞患者血清を用いて、超遠心分離により得たLDL（ $1.006\text{ g/ml} < d < 1.063\text{ g/ml}$ ）を抗ヒトフィブロネクチンイムノアフィニティクロマト手法によって、LDL-フィブリノーゲン複合体、LDL-フィブロネクチン複合体を単離精製した。このLDL-フィブリノーゲン複合体、LDL-フィブロネクチン複合体を形成するLDLの性質として、酸化LDLに特徴的な脂質過酸化物の増加、ApoB蛋白の崩壊、そしてLDL粒子全体の陰性荷電の増加を認めた。さらに、ゲル濾過分析にて得た各画分を用いたELISAから、LDL画分中にLDL-フィブリノーゲン複合体、LDL-フィブロネクチン複合体の存在が確認された。

## 【0050】

そこで本発明者らは、LDLないしは酸化LDLがフィブロネクチンという好都合な標識を付けて存在する事実に着目し、酸化LDLと複合体を形成するフィブロネクチンを特異的に認識するモノクローナル抗体を作製できれば、この抗体を用いて血液中のLDLないしは酸化LDLとフィブロネクチンの複合体を認識、測定、単離精製することが可能と考えた。

## 【0051】

抗体作製時の抗原には、人工的に調整した酸化LDL-フィブロネクチン複合体を用いた。得られた抗体のフィブロネクチンに対する反応特異性は、nativeフィブロネクチンには反応性を示さないが、酸化LDLと複合体を形成するフィブロネクチンを認識した。また、本抗体は、ApoB蛋白は認識しないことも判明した。

## 【0052】

### （E-2）抗ヒト酸化LDL結合フィブロネクチンモノクローナル抗体の作製法

（モノクローナル抗体作製法の一例）

〔抗原の調整〕

ヒト血清から超遠心分離により得たLDL（ $1.006\text{ g/ml} < d < 1.06$

3 g/ml) を抗ヒト $\alpha$ 1 アンチトリプシンポリクローナル抗体を用いたイムノアフィニティーカラムを通し、LDL- $\alpha$ 1 アンチトリプシン複合体を除去する。この $\alpha$ 1 アンチトリプシンフリーのLDLに精製ヒトフィブロネクチンを添加し、硫酸銅液を加え、37℃に1夜放置して、酸化LDL-フィブロネクチン複合体を形成させた。

## 【0053】

LDLとフィブロネクチンの複合体形成の確認は、複合体を試料としてゲル濾過分析により得た各画分についてELISA（固相抗体として抗ヒトフィブロネクチン抗体、酵素標識抗体に抗ヒトApoB抗体を用いる。）を実施することにより確認できる。

## 【0054】

## 〔動物への免疫〕

この複合体（抗原）をリン酸緩衝生理食塩水で蛋白濃度として1 mg/ml溶液となるように調整し、この溶液をフロインドアジュバンドを等量混合して得られるエマルジョンを、6週令のマウス（Balb/C系マウス）の腹腔内に500  $\mu$ l投与した。この作業を2週間おきに計3回免疫を行った。

## 【0055】

## 〔細胞融合〕

最終免疫後4日目に、このマウスの脾臓から採取した脾リンパ球細胞をマウス骨髄腫細胞(P3-X63-Ag8-U1)と融合させた。

融合方法は、常法に従い、50%ポリエチレングリコール4000溶液を融合促進剤として用い、融合促進剤の添加、混合および希釈の各操作からなる融合時間を10分間、37℃で行った。次に、HAT培地（ヒポキサンチン・チミジン・10%ウシ胎児血清を含むRPMI培地）を各ウェルに分注し、2～3日後、抗体産生ハイブリドーマの選択を行った。

## 【0056】

選択方法は、酸化LDL-IgA複合体、native IgA、native apoBを各々固定化した96穴マイクロプレートに、各ウェルのハイブリドーマ形成コロニーの培養上清を100  $\mu$ l分注して反応させ、ついで洗浄後、ペルオキシダーゼ

標識抗マウスイムノグロブリン抗体を  $100\mu\text{l}$  添加して、抗原抗体反応させ、洗浄、呈色と ELISA の常法に従って操作し、目的とする抗体（酸化 LDL 結合フィブロネクチンに反応性を示すが、native フィブロネクチン、native apo B には反応しない抗体）産生ハイブリドーマを複数個選択した。次に、目的とする抗体産生を示したコロニーを回収し、限界希釈法によってハイブリドーマの単一コロニーを得るようにクローニングを行った。この方法は、回収したコロニーを HT 培地で希釈し、96 穴マイクロプレートの各ウェルにハイブリドーマがウェル当たり 1 個以下となるようにフィーダー細胞と共に散布した。以上の操作を 2 回行い、モノクローン化された抗ヒト酸化 LDL 結合フィブロネクチン抗体産生ハイブリドーマを複数個得た。

## 【0057】

〔抗ヒト酸化 LDL 結合フィブロネクチンモノクローナル抗体の腹水化〕

8 週令のマウス（Balb/C 系マウス）の腹腔内にプリスタン（免疫抑制剤）を投与した。3～7 日後に抗体産生ハイブリドーマを腹腔内に投与し、約 7 日後にマウス腹腔から腹水化された抗体を回収した。

## 【0058】

〔抗体の精製〕

腹水化して得られたそれぞれの抗体を 50% 硫酸アンモニウムで 2 回塩析分離を行い、リン酸緩衝生理食塩液にて透析して精製し、複数個の抗ヒト酸化 LDL 結合フィブロネクチンモノクローナル抗体と人工的に調整した酸化 LDL-フィブロネクチン複合体をそれぞれ反応させ、二次抗体として抗ヒト Apo B 酵素標識抗体を用いた ELISA において感度に優れた、抗ヒト酸化 LDL 結合フィブロネクチンモノクローナル抗体（OFN-1 と命名）を選定した。

## 【0059】

（E-3）本発明によれば、被検体の血液成分を本発明の抗体と接触させ、該抗体と特異的に反応した抗原量を定量することにより、血液中に含まれる LDL ないしは酸化 LDL-フィブロネクチン複合体を測定することができる。測定法はラジオイムノアッセイ、酵素免疫法、イムノブロット法、免疫沈降法、蛍光イムノアッセイ、化学若しくは生物発光イムノアッセイなどの公知法によって行わ

れる。

#### 【0060】

酵素免疫法（ELISA）によるLDLないしは酸化LDL-フィブロンネクチン複合体の測定法を例にとり、以下に具体的に説明する。

##### 〔マイクロプレートへの抗体の固定化〕

マイクロプレート（NUNC社製）の各ウェルに、抗ヒト酸化LDL結合フィブロンネクチンモノクローナル抗体（OFN-1） $5\mu\text{g/ml}$ を含む $0.1\text{M}$ トリス緩衝液（ $\text{pH}8.4$ ）を $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、一夜 $4^{\circ}\text{C}$ で放置して抗体を固相に吸着させる。

#### 【0061】

##### 〔酵素標識抗体の調整〕

別途、抗ヒトApoBポリクローナル抗体、あるいは抗ヒトApoBモノクローナル抗体（酸化LDLを抗原として作製したもの）をペプシンと2-メルカプトエタノールアミンによりFab'に標識して酵素標識抗体を調整する。

#### 【0062】

〔血清中あるいは血漿中LDLないしは酸化LDL-フィブロンネクチン複合体の測定〕

各ウェルに $100\mu\text{l}$ の $1\%$ ウシアルブミンを含むトリス緩衝液（ $0.1\text{M}$ 、 $\text{pH}8.0$ ）を分注、次いで血清もしくは血漿 $50\mu\text{l}$ を加えて混和した後、 $37^{\circ}\text{C}$ で2時間反応させる。次に洗浄液（Tween20を終濃度 $0.005\%$ 含むリン酸緩衝液： $0.02\text{M}$ ： $\text{pH}7.4$ ）で3回洗浄する。

#### 【0063】

その後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトApoBFab'抗体溶液（ $1\%$ ウシアルブミンを含むトリス緩衝液）を各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ加え混合した後、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させ、先と同様に3回洗浄する。

基質発色液は、 $1.66\text{mM}$  TMBZ（同仁化学）をメタノールで溶解後、メタノール濃度が $50\%$ になるように $0.2\text{M}$ トリス緩衝液を加えた基質溶液と、 $0.02\%$ 過酸化水素を含む $35\text{mM}$ クエン酸溶液とを等量ずつ混和した溶液 $100\mu\text{l}$ を各ウェルに加え、室温で10分間放置後、反応停止液（ $2.5\text{M}$ リン酸

溶液) 100  $\mu$ l を各ウェルに加える。

【0064】

マイクロプレート用比色計を用いて450/630nmの波長で比色し吸光度を算出する。人工的に調整した酸化LDL-フィブロネクチン複合体を上述と同様の操作にて反応させ、作製した検量線から試料中のLDLないしは酸化LDL-フィブロネクチン複合体濃度を算出する。

【0065】

(E-4) また、本発明によれば、LDLもしくは酸化LDLとフィブロネクチン複合体を含む動脈硬化性疾患に関わる新規なりボ蛋白は、細胞外基質成分に対して沈着性が強力であることから、固相に細胞外基質蛋白を固定化し、この蛋白に結合させたLDLないしは酸化LDLとフィブリノーゲンもしくはフィブリン(又はそれぞれの分解産物)との複合体、およびLDLないしは酸化LDLとフィブロネクチンの複合体を含む動脈硬化性病変に関わる新規なりボ蛋白を検出する方法について述べる。固相化に細胞外基質蛋白として、血管をはじめ皮膚、骨、腱、筋などの生体のほとんどすべての組織に存在するコラーゲンを用いた測定法を例にとり、以下に具体的に説明する。

【0066】

〔マイクロプレートへの細胞外基質蛋白の固定化〕

マイクロプレート(NUNC社製)の各ウェルにI型コラーゲンを10  $\mu$ g/mlを含む0.1Mトリス緩衝液(pH8.4)を100  $\mu$ lずつ分注し、37℃で放置して蒸発乾固させてコラーゲンを固相に吸着させる。

【0067】

〔酵素標識抗体の調整〕

別途、抗ヒトApoBポリクローナル抗体、あるいは抗ヒトApoBモノクローナル抗体(酸化LDLを抗原として作製したもの)をペプシンと2-メルカプトエタノールアミンによりFab'として、ペルオキシダーゼをこのFab'に標識して酵素標識抗体を調整する。

【0068】

〔血清中あるいは血漿中のコラーゲン結合性リボ蛋白の測定〕

各ウェルに  $100\mu\text{l}$  の  $1\%$  ウシアルブミンを含むトリス緩衝液 ( $0.1\text{M}$ 、 $\text{pH} 8.0$ ) を分注、次いで血清もしくは血漿  $50\mu\text{l}$  を加えて混和した後、 $37^\circ\text{C}$  で  $2$  時間反応させる。次に洗浄液 (Tween20 を終濃度  $0.005\%$  含むリン酸緩衝液:  $0.02\text{M}$ :  $\text{pH} 7.4$ ) で  $3$  回洗浄する。その後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト A p o B F a b' 抗体溶液 ( $1\%$  ウシアルブミンを含むトリス緩衝液) を各ウェルに  $100\mu\text{l}$  ずつ加え混和した後、 $37^\circ\text{C}$  で  $1$  時間反応させ、先と同様に  $3$  回洗浄する。

## 【0069】

基質発色液は  $1.66\text{mM}$  TMBZ (同仁化学) をメタノールで溶解後、メタノール濃度が  $50\%$  になるように  $0.2\text{M}$  トリス緩衝液を加えた基質溶液と、 $0.02\%$  過酸化水素を含む  $35\text{mM}$  クエン酸溶液とを等量ずつ混和した溶液  $100\mu\text{l}$  を各ウェルに加え、室温で  $10$  分間放置後、反応停止液 ( $2.5\text{M}$  リン酸溶液)  $100\mu\text{l}$  を各ウェルに加える。

マイクロプレート用比色計を用いて  $450/630\text{nm}$  の波長で比色し吸光度を測定する。

ヒト血清からコラーゲンを固定化したアフィニティーカラムで単離・精製したコラーゲン結合性リポ蛋白について上述と同様の操作にて反応させ、作成した検量線から試料中のコラーゲン結合性リポ蛋白濃度を算出する。

## 【0070】

(E-5) さらに、本発明によれば LDL か酸化 LDL とフィブリノーゲンやフィブリン (又はそれぞれの分解産物) もしくは、フィブロネクチンとの複合体を含む動脈硬化性病変に関わる新規なりポ蛋白はポリスチレンやナイロンなどの高分子化合物に対して結合性が強力であることから、固相法によっても該リポ蛋白を測定することができる。固相にポリスチレン製マイクロプレートを用いた方法を例にとり、具体的に説明する。

## 【0071】

## 〔酵素標識抗体の調整〕

別途、抗ヒト A p o B ポリクローナル抗体、あるいは抗ヒト A p o B モノクローナル抗体 (酸化 LDL を抗原として作製したもの) をペプシンと 2-メルカプト

エタノールアミンにより F a b' として、ペルオキシダーゼをこの F a b' に標識して酵素標識抗体を調整する。

## 【 0 0 7 2 】

〔血清中あるいは血漿中の動脈硬化性病変に関わる新規なりポ蛋白の固相法による測定〕

無処理のポリスチレン製マイクロプレート（NUNC社製）の各ウェルに 1 0 0  $\mu$  l の 1 % ウシアルブミンを含むトリス緩衝液（0. 1 M、pH 8. 0）を分注、次いで血清もしくは血漿 5 0  $\mu$  l を加えて混和した後、3 7 °C で 2 時間反応させる。次に洗浄液（Tween20 を終濃度 0. 0 0 5 % 含むリン酸緩衝液：0. 0 2 M：pH 7. 4）で 3 回洗浄する。

## 【 0 0 7 3 】

その後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト A p o B F a b' 抗体溶液（1 % ウシアルブミンを含むトリス緩衝液）を各ウェルに 1 0 0  $\mu$  l ずつ加え混和した後、3 7 °C で 1 時間反応させ、先と同様に 3 回洗浄する。

基質発色液は 1. 6 6 m M T M B Z（同仁化学）をメタノールで溶解後、メタノール濃度が 5 0 % になるように 0. 2 M トリス緩衝液とを等量ずつ混和した溶液 1 0 0  $\mu$  l を各ウェルに加え、室温で 1 0 分間放置後、反応停止液（2. 5 M リン酸溶液）1 0 0  $\mu$  l を各ウェルに加える。マイクロプレート用比色計を用いて 4 5 0 / 6 3 0 nm の波長で比色し吸光度を算出する。ヒト血清からコラーゲンを固定化したアフィニティーカラムで単離・精製した L D L か酸化 L D L とフィブリノーゲンやフィブリン（又はそれぞれの分解産物）との複合体、L D L もしくは酸化 L D L - フィブロンネクチン複合体を含む動脈硬化性病変に関わる新規なりポ蛋白を上述と同様の操作にて反応させ、作成した検量線から試料中の該りポ蛋白濃度を算出する。

## 【 0 0 7 4 】

また、本発明によれば L D L もしくは酸化 L D L とフィブリノーゲンもしくはフィブリン（又はそれぞれの分解産物）との複合体を含む動脈硬化性病変に関わる新規なりポ蛋白の検出方法についても以下に具体的に説明する。

## 【 0 0 7 5 】

## 〔マイクロプレートへの抗体の固定化〕

マイクロプレート（NUNC社製）の各ウェルに、抗ヒトフィブリノーゲン抗体（DAKO） $5\mu\text{g/ml}$ を含む $0.1\text{M}$ トリス緩衝液（ $\text{pH}8.4$ ）を $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、一夜 $4^{\circ}\text{C}$ で放置して抗体を固相に吸着させる。

## 【0076】

## 〔酵素標識抗体の調整〕

別途、抗ヒトApoBポリクローナル抗体、あるいは抗ヒトApoBモノクローナル抗体をペプシンと2-メルカプトエタノールアミンによりFab'に標識して酵素標識抗体を調整する。

## 【0077】

〔血清中のLDLないしは酸化LDL／フィブリノーゲンもしくはフィブリン（又はそれぞれの分解産物）複合体（LDL-フィブリノーゲン関連物質複合体と略記することがある）の測定〕

各ウェルに $100\mu\text{l}$ の $1\%$ ウシアルブミンを含むトリス緩衝液（ $0.1\text{M}$ 、 $\text{pH}8.0$ ）を分注、次いで血清 $50\mu\text{l}$ を加えて混和した後、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させる。次に洗浄液（Tween20を終濃度 $0.005\%$ 含むリン酸緩衝液： $0.02\text{M}$ ： $\text{pH}7.4$ ）で3回洗浄する。

その後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトApoBFab'抗体溶液（ $1\%$ ウシアルブミンを含むトリス緩衝液）を各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ加え混合した後、 $37^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させ、先と同様に3回洗浄する。

## 【0078】

基質発色液は、 $1.66\text{mM}$ TMBZ（同仁化学）をメタノールで溶解後、メタノール濃度が $50\%$ になるように $0.2\text{M}$ トリス緩衝液を加えた基質溶液と、 $0.02\%$ 過酸化水素を含む $35\text{mM}$ クエン酸溶液とを等量ずつ混和した溶液 $100\mu\text{l}$ を各ウェルに加え、室温で10分間放置後、反応停止液（ $2.5\text{M}$ リン酸） $100\mu\text{l}$ を各ウェルに加える。

## 【0079】

マイクロプレート用比色計を用いて $450/630\text{nm}$ の波長で比色し吸光度を算出する。人工的に調整した酸化LDL-フィブリノーゲン複合体を上述と同様

の操作にて反応させ、作成した検量線から試料中のLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体濃度を算出する。

【0080】

(E-6) LDL画分中に存在するLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体、LDL-フィブロネクチン複合体およびコラーゲン結合性LDLの確認

ヒト血清を超遠心分離し、得られたLDL ( $1.006 < d < 1.063 \text{ g/ml}$ ) 画分を用いてゲル濾過分析を行い、各フラクションについて以下の如き組み合わせでELISAを実施した。即ち、LDL (抗ヒトApoB/抗ヒトApoB)、LDL/フィブロネクチン複合体 (抗ヒトフィブロネクチン/抗ヒトApoB)、LDL/フィブリノーゲン複合体 (抗ヒトフィブリノーゲン/抗ヒトApoB)、コラーゲン接着性LDL (コラーゲン/抗ヒトApoB) を測定した結果、図2に示すごとくLDL画分中にLDL/フィブロネクチン複合体、LDL/フィブリノーゲン複合体、コラーゲン接着性LDLの存在を認めた。

【0081】

(E-7) 血中Lp(a)濃度とコラーゲン結合性Lp(a)濃度の関係および、血中LDL/フィブリノーゲン関連物質との複合体濃度とコラーゲン結合性LDL濃度の関係

細胞外基質成分への結合性を示すが由に動脈硬化症の危険因子とされているLp(a)は、血中のLp(a)濃度依存性にコラーゲン結合性Lp(a)として検出される。即ち、血中に存在するLp(a)はすべて細胞外基質成分への結合特性を有することが示唆される(図3a)。Cushingらはアポ蛋白(a)が細胞外基質蛋白と結合しやすい可能性を示唆している(Arteriosclerosis, 9:593, 1989)。LDLではその一部が細胞外基質成分への結合性を示すにすぎず(図3b)、血中のLDL総量から細胞外基質成分結合性のリポ蛋白量を推定することはできない。しかし、血中のLDL/フィブリノーゲン複合体濃度とコラーゲン結合性LDL濃度の相関性は(図3c)のごとく良好であることから、LDL/フィブリノーゲン複合体とコラーゲン結合性LDLは同一物質である可能性が示唆される。従って、LDLが細胞外基質蛋白と結合性を示すのはLDLに結合しているフィブリノーゲン関連蛋白に依存している可能性が示唆される。つまり、血

中LDL中にLp(a)と同様の細胞外基質成分結合性のリポ蛋白(動脈硬化症惹起性リポ蛋白)が存在する。

【0082】

(E-8) 健常者血清中のLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体濃度の分布

健常者血清中のLDL-フィブリノーゲン関連物質の濃度は図4の如くである。

【0083】

(E-9) 健常者、糖尿病患者およびマルチプルリスクファクター症候群患者血清中のLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体量

図5に示すごとく糖尿病患者およびマルチプルリスクファクター症候群患者血清中のLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体量は健常者に比べて有意に高値であった。

【図面の簡単な説明】

【図1】

血中脂質濃度が異なる3群間におけるLDLもしくは変性LDLと急性相反応蛋白(A)、凝固・線溶系蛋白(B)、殺菌蛋白(C)との複合体濃度の比較を図示したものである。

【図2】

LDL画分中に存在するLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体、LDL-フィブロネクチン複合体およびコラーゲン結合性リポ蛋白を示したものである。

【図3】

血中Lp(a)濃度と細胞外基質蛋白(コラーゲン)結合性Lp(a)濃度の関係、血中LDL-コレステロール濃度と動脈硬化性病変に関わる新規なりポ蛋白濃度、および、LDL-フィブリノーゲン関連物質複合体濃度とコラーゲン結合性LDL濃度の関係を示したものである。

【図4】

健常者血清中のLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体濃度の分布を示したものである。

【図5】

健常者、糖尿病患者およびマルチプルリスクファクター症候群患者血清中のLD  
L-フィブリノーゲン関連物質複合体量の比較を示したものである。

図面

【書類名】

【図 1】

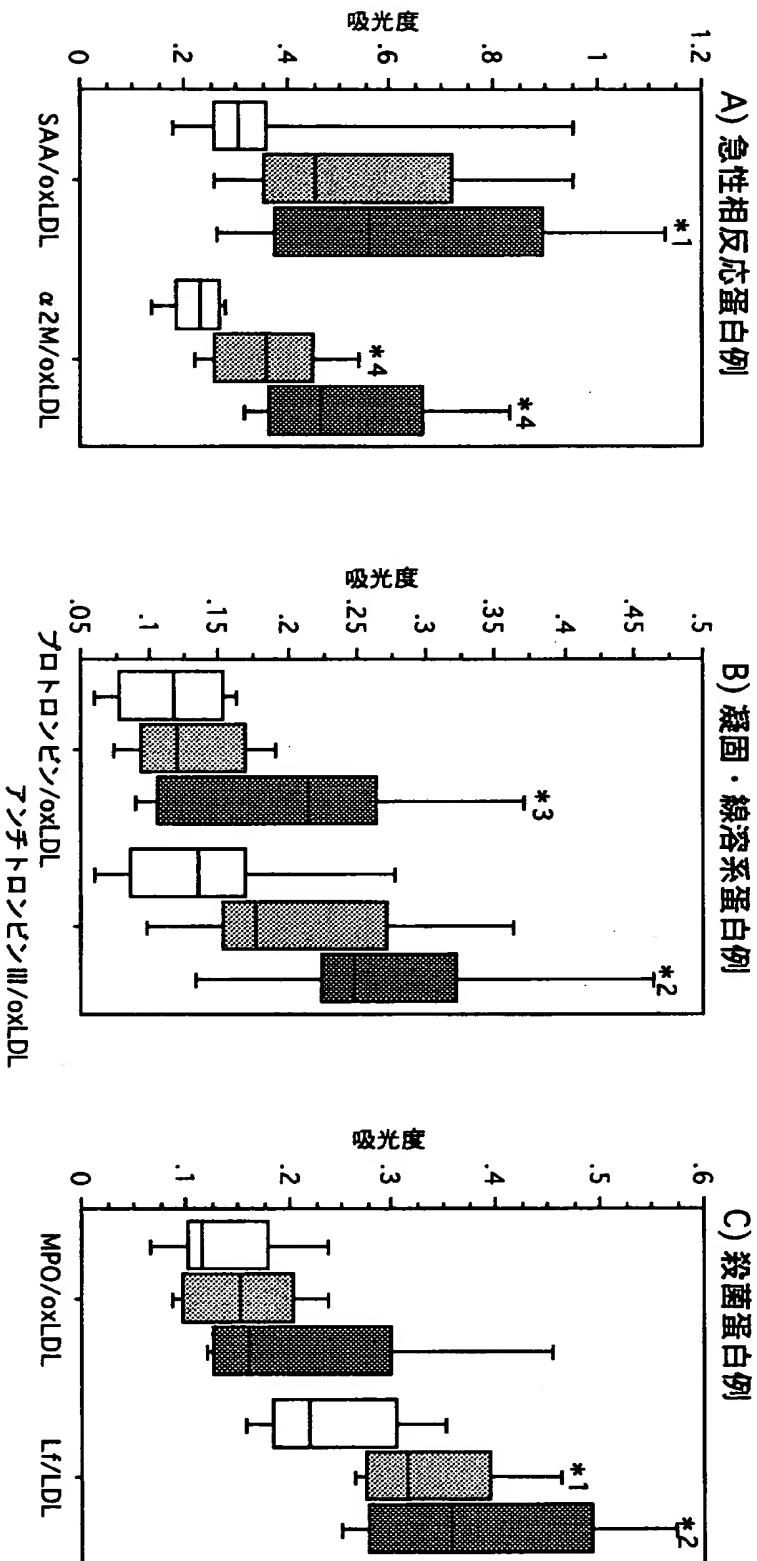
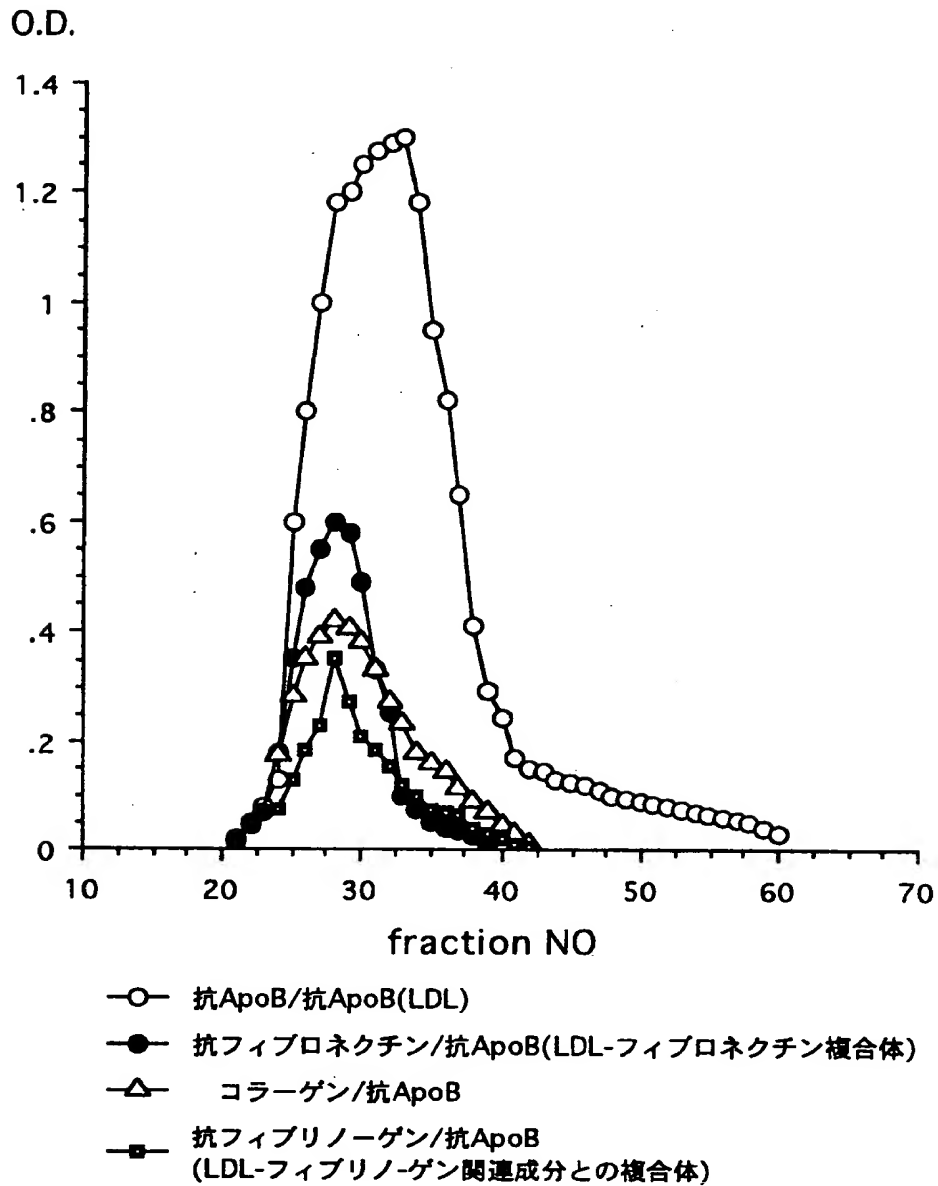


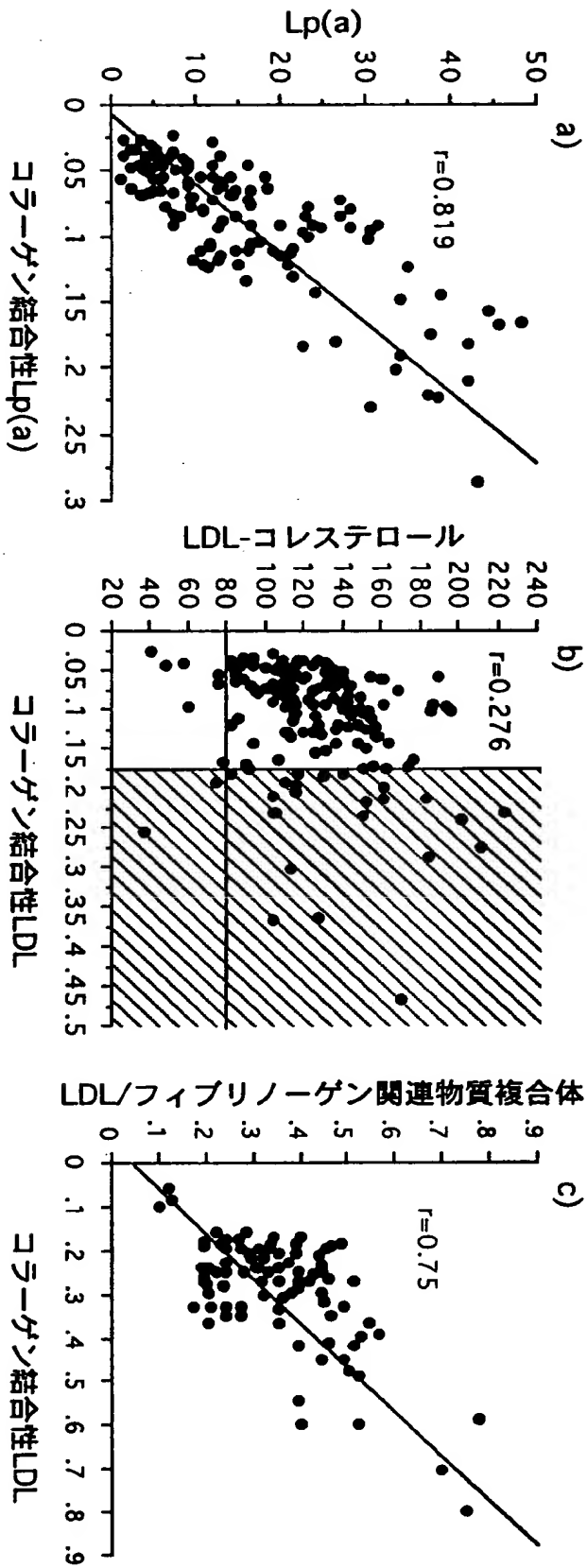
図 1 血中脂質濃度が異なる3群間におけるLDLもしくは変性LDLと急性相反応蛋白(A)、凝固・線溶系蛋白(B)、殺菌蛋白(C)との複合体濃度の比較

【図2】



ヒト血清LDL画分中に存在するLDL-フィブリノーゲン関連成分との複合体、LDL-フィブロネクチン複合体およびコラーゲン結合性リポ蛋白

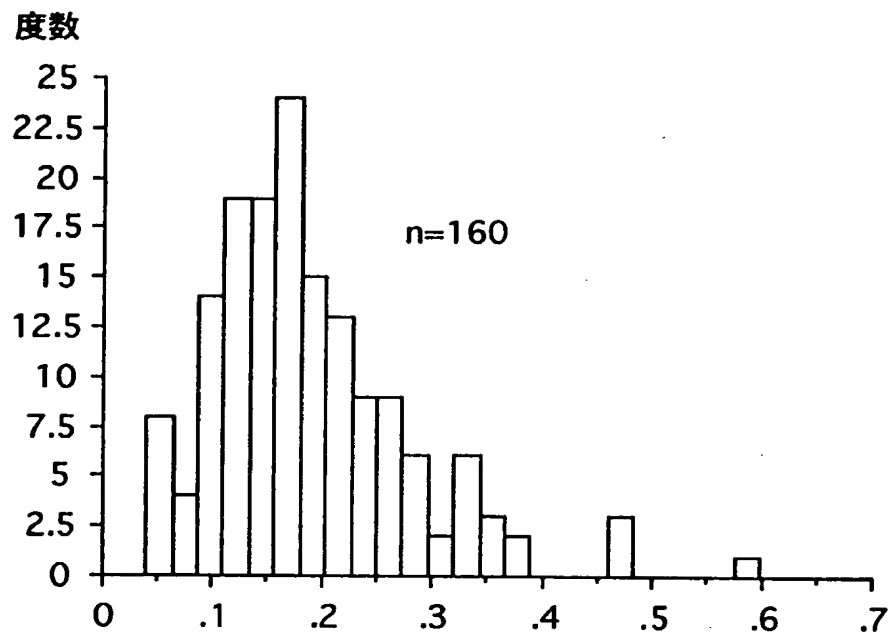
【図3】



Williamsら (Arterioscler, Trom, 15: 551, 1995) による新たな動脈硬化発症機序仮説 (血管内皮下の脂質沈着を発端とする機序仮説) では、血中LDLコレステロール濃度が80mg/dl以上になれば血管内皮下に脂質沈着が生ずることを示唆しているが、本発明者らは血中にLp(a)と同様に動脈硬化性疾患に関わる新規ナリホ蛋白 (LDL-フィブリノーゲン関連物質との複合体を含む細胞外基質成分結合性リホ蛋白: コラーゲン結合性LDLなど) が存在することが、血管内皮下における脂質沈着発生に必須であることを見出した。(図2b中、斜線部分に存在する症例が動脈硬化性疾患に関わる新規ナリホ蛋白陽性例)

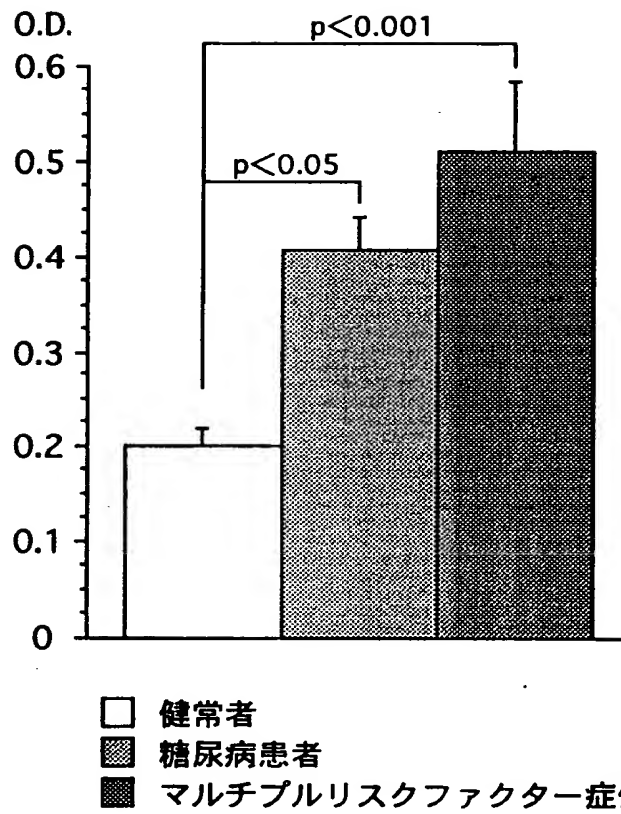
血中Lp(a)濃度と細胞外基質蛋白 (コラーゲン) 結合性Lp(a)濃度の関係、血中LDL-コレステロール濃度と動脈硬化性疾患に関わる新規ナリホ蛋白濃度、およびLDL-フィブリノーゲン関連成分との結合体濃度とコラーゲン結合性LDL濃度の関係

【図 4】



健常者血清中のLDL-フィブリノーゲン関連  
物質複合体濃度の分布

【図 5】



健常者、糖尿病患者、マルチプルリスクファクター症候群  
 におけるLDL-フィブリノーゲン関連物質複合体量の比較

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】動脈硬化症やアルツハイマー病の発症・進展と深く関わる、LDLおよび変性LDL（特に酸化LDL）の新規な検出方法を提供する。

【解決手段】変性低比重リポ蛋白（特に酸化LDL）と、急性相反応物質、血液凝固・線溶系関連蛋白、もしくはマクロファージが産生する殺菌物質との複合体を測定対象にする。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 0 - 0 1 2 2 1 0
受付番号	5 0 0 0 0 0 5 6 4 1 5
書類名	特許願
担当官	第七担当上席 0 0 9 6
作成日	平成 1 2 年 1 月 2 5 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000141875
【住所又は居所】	京都府京都市伏見区羽束師古川町 3 2 8 番地
【氏名又は名称】	株式会社いかがく

【代理人】

申請人

【識別番号】	100085316
【住所又は居所】	大阪府大阪市中心区伏見町 3 丁目 3 番 3 号 芝川ビル 2 階 1 号 福島特許商標事務所
【氏名又は名称】	福島 三雄

【選任した代理人】

【識別番号】	100100376
【住所又は居所】	大阪府大阪市中心区伏見町 3 丁目 3 番 3 号 芝川ビル 2 階 1 号 福島特許商標事務所
【氏名又は名称】	野中 誠一

【選任した代理人】

【識別番号】	100110685
【住所又は居所】	大阪市中心区伏見町 3 丁目 3 番 3 号 芝川ビル 2 階 1 号 福島特許商標事務所
【氏名又は名称】	小山 方宜

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 1 4 1 8 7 5 ]

1. 変更年月日	1 9 9 5 年 7 月 2 7 日
[変更理由]	名称変更
住 所	京都府京都市伏見区羽束師古川町 3 2 8 番地
氏 名	株式会社いかがく